

# 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究

葛胜祥<sup>1</sup> 张 军<sup>1</sup> 黄果勇<sup>2</sup> 逢淑强<sup>1</sup> 周开姣<sup>2</sup> 夏宁邵<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

(<sup>2</sup>广西壮族自治区卫生防疫站 南宁 430021)

**摘 要:** 在大肠杆菌中表达的一段戊型肝炎病毒(HEV) 结构蛋白 NE2, 纯化后以弗氏佐剂, 按 0d, 10d, 30d 的方案 10<sup>4</sup>g 针的剂量免疫 3 只恒河猴, 在第 2 周抗体阳转, 第 6 周时 1 只滴度达 1 : 100 000, 另 2 只滴度 1 : 20 000, 此时以 10<sup>6</sup> PCR 滴度的 HEV 病毒粪悬液攻击。对照组 3 只均出现血清转氨酶(ALT) 升高, 抗体阳转, 粪便持续排毒 1 月以上; 疫苗组无一发病, 未检出非疫苗来源的抗体, 其中 1 只始终未检出粪便排毒, 另 2 只仅出现短暂排毒。以一份 NE2 免疫后猴血清(滴度 1 : 20 000) 与 10<sup>3</sup> PCR 滴度的病毒混匀后感染 2 只恒河猴, 结果对照组 2 只均持续排毒 3 周以上, 抗体阳转, 1 只 ALT 明显升高; 而抗体中和组 2 只猴始终未检出粪便排毒, 抗 NE2 抗体缓慢下降, ALT 正常。这些结果表明 NE2 具有良好的免疫原性和免疫保护性, 有可能成为有效的戊肝疫苗。

**关键词:** 戊型肝炎病毒, 疫苗, 动物保护, 原核表达

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2003) 01-0035-08

戊型肝炎(戊肝)是一种经肠道传播的急性肝炎, 临床表现与甲型肝炎类似, 但黄疸较为常见, 一般呈良性经过, 但孕妇感染病情较重, 死亡率可高达 20%。戊肝主要流行于亚洲、非洲和中美洲发展中国家, 是一种世界性的危害严重的传染病, 我国是戊肝主要流行区之一, 新疆、吉林、辽宁、内蒙古及山东等地均有戊肝暴发流行的报道<sup>[1]</sup>。因此, 戊肝疫苗被世界卫生组织(WHO)列为新世纪最应优先开发的疫苗之一。

戊型肝炎病毒(HEV)含 3 个开放读码框架(ORF), 其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的多肽(PORF2), 为病毒主要结构蛋白, 组成病毒衣壳, 也是感染血清抗体识别的主要区域<sup>[2]</sup>。在过去的研究中, 我们利用谷胱甘肽转移酶(GST)融合表达载体在大肠杆菌中表达了 ORF2 的 aa394~ aa604 的区域(E2)的重组蛋白(GE2), 在 SDS-PAGE 中可形成二聚体, 而且二聚体对戊肝阳性血清的反应性要明显优于单体, 提示二聚体的形成使某些重要表位得以充分暴露; 用该重组蛋白免疫恒河猴显示出一定的保护性<sup>[3-5]</sup>。由于 GST 融合蛋白难以应用于疫苗的生产, 因此我们将该片段克隆至一个非融合表达载体, 表达出的重组蛋白 NE2 在溶液中形成从二聚体到十二聚体的多种聚合形式, 可能模拟了病毒子粒的装配过程(结果另文发表), 本研究将纯化的 NE2 免疫恒河猴, 以进一步系统观察其免疫原性和

\* 通讯作者, Tel: 0592-2184110, E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

作者简介: 葛胜祥(1975-), 男, 湖北通城人, 厦门大学生命科学院生化与分子生物学专业硕士研究生, 主要从事基因工程和免疫学研究。

收稿日期: 2002-02-28, 修回日期: 2002-04-08

对 HEV 攻击的免疫保护性, 同时在恒河猴中进行 NE2 诱生抗体的病毒中和实验, 以观察抗体中和病毒的能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验所用 10 只恒河猴捕自中国南部地区, 1~2 岁, 实验前进行常规医学观察, 并持续 2 周检测血清转氨酶(ALT)水平, 免疫前检测抗 HEV 抗体, 均为抗 HEV 抗体阴性的健康猴, 实验期间分笼喂养。

### 1.2 HEV 重组疫苗

HEV 重组疫苗 NE2 为大肠杆菌表达的非融合蛋白, 包含 HEV ORF2 的 aa394~aa604 的片段, 主要以包涵体形式表达。包涵体经 4mol/L 尿素洗涤后取上清透析复性, 再经分子筛 HPLC 纯化, 纯度大于 95%。

### 1.3 免疫方案

上臂三角肌肌肉注射, 每次疫苗接种量为 10 $\mu$ g/0.5mL, 按 0d, 10d, 30d 方案接种 3 针。第 1 次接种采用弗氏完全佐剂, 其余采用弗氏不完全佐剂。3 只恒河猴为疫苗组(编号为 No6, No7, No8), 另 3 只为对照组(编号为 No1, No2, No3)。

### 1.4 病毒攻击

1988 年新疆 HEV 流行时的一份病人粪便感染恒河猴一代后的阳性粪便(PCR 滴度为 10<sup>6</sup>), 以生理盐水制成 20% 悬液(含 0.1% 氨苄青霉素), 与 1:8 生理盐水稀释的 HEV 阳性胆汁等体积混合后, 1mL/只静脉注射恒河猴。攻击时间为初免后第 6 周。

### 1.5 免疫血清中和保护实验

取 1 只 NE2 免疫后 35 周的猴血清 1mL(抗 NE2 抗体滴度为 1:20 000), 混匀后与等体积 HEV 阳性粪便悬液上清混匀(最终病毒 PCR 滴度为 10<sup>3</sup>), 37℃ 吸附 2h, 4℃ 过夜; 1mL/只分别静脉注射恒河猴(编号为 Km13 和 Km14), 对照组为阴性猴血清与病毒悬液的混合液静脉注射(编号为 Km5 和 Km6)。

### 1.6 标本采集

免疫前采集静脉血, 免疫开始每周采血 1 次, 攻毒后每周采血 2 次, 肝素抗凝, 同时检测血浆 ALT 水平, 余贮存于 -20℃ 备检; 从攻毒后第 1 天开始每天采集粪便, 3 周后每 3 天收集 1 次, 至对照组粪便排毒阴转连续 3 次, 粪便采集后贮存于 -70℃, 2 周内以 RT-PCR 检测 HEV 病毒。

### 1.7 血浆抗-HEV 检测

采用三种方法。一是 Genelabs 公司生产的抗-HEV IgG 抗体 ELISA 试剂盒, 一是北京万泰生物药业有限公司的生产的抗-HEV IgG 抗体 ELISA 试剂盒(采用加拿大 YES 公司抗原), 另一为本室自制的抗-HEV IgG 抗体 ELISA 试剂盒。前两个试剂盒的操作严格按产品说明进行, 本室自制试剂盒过程如下: HPLC 纯化的 NE2 抗原, 溶解于 0.05mol/L 碳酸包被缓冲液(pH9.5)中, 浓度为 0.3 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ L/孔包被 96 孔聚乙烯微量滴定板, 37℃ 吸附 2h, 4℃ 过夜; PBST 洗液(pH7.4)洗涤 1 遍, 200 $\mu$ L/孔封闭液(含 2% 明胶、0.2% 酪蛋白和 2% 蔗糖的 PBS) 37℃ 封闭 2h, 甩尽、拍干后真空封闭, 4℃ 保存备用。检测时, 于每孔中加入

100μL 样品稀释液(20nmol/L pH7.2 PBS, 1% 酪蛋白), 然后加入 10μL 待检血清, 轻拍混匀后于 37℃温育 30 min; 然后用 PBST 洗涤 5 次, 拍干后每孔加入 100μL 稀释好的抗人 IgG-HRP(北京万泰生物药业公司提供), 轻拍混匀后 37℃温育 30 min; 洗涤 5 次, 扣干, 加入显色剂(TMB 底物, 北京万泰生物药业有限公司提供), 37℃温育 10 min 后, 加终止液 50μL(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 终止, 于酶标仪(TECAN 公司)上读取 OD<sub>450</sub> 620nm 的读值。

1.8 病毒核酸检测

以反转录 PCR(RF-PCR) 方法检测粪便中的 HEV RNA。粪便标本以 0.01 mol/L PBS (pH7.4) 制成 10% 悬液, 4℃ 15 000r/min 离心 15min, 取上清 250μL 用 TRIZOL 试剂(GIBCO 公司)按操作说明提取 RNA; 提取的 RNA 以配好的反转录体系溶成 20μL, 进行反转录, 反转录引物 A3(5'-ggctcacccggagtgttctc-3')。取 2μL 反转录产物进行第一 PCR 扩增, 反应体积 20μL, 引物为 A5(5'-cttgatgacaccgt dtctcg-3') 和 A3, 反应条件为: 94℃预变性 5min; 94℃ 40s, 68℃ 40s 35 个循环; 72℃延伸 5min; 取 1μL 第一轮 PCR 产物, 在 20μL 反应体积中进行第二轮 PCR, 引物为 B5(5'-gcgcagcaaggcatccatg-3') 和 B3(5'-gtgtttcttccaaaacctcg-3'), 条件为 94℃预变性 5min; 94℃ 40s, 56℃ 40s, 72℃ 80s 35 个循环; 72℃延伸 5min。

1.9 血浆 ALT 检测

采用赖氏法<sup>[9]</sup>。

1.10 主要试剂和仪器设备

AMV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 为 Promega 公司产品; RNA 酶抑制剂(RNasin) 为华美公司产品; 各种常规化学试剂为国产分析纯; PCR 仪为德国 Biometra T3 型; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂为厦门大学抗癌中心提供。

2 结 果

2.1 NE2 疫苗的免疫原性

NE2 疫苗免疫恒河猴后, 以 NE2-ELISA 检测抗体, 第 2 周即有 2 只阳转, 另 1 只(No7)在第 3 周阳转, 随后抗体持续上升(图 1), 至第 6 周时, No6 的抗体滴度已达 1: 100 000, No7、No8 的抗体滴度达 1: 20 000, 而 3 只对照猴抗体始终为阴性。

2.2 NE2 免疫对恒河猴的保护性

在 NE2 免疫后第 6 周, 以 10<sup>6</sup> PCR 滴度的 HEV 病毒静脉感染实验猴, 从图 2 可见, 对照组 2 只猴(No1、No2)在感染后第 4 周开始 ALT 明显升高, 第 5 周达高峰(均超过 400U), 在第 6 周时出现第二个峰, 后迅速下降, 至第 7 周时已恢复正常; 另 1 只对照猴(No3)在感染后 1 周时 ALT 达 55U, 随后缓慢下降, 并稍有波动; 疫苗组 3 只猴子则始终未

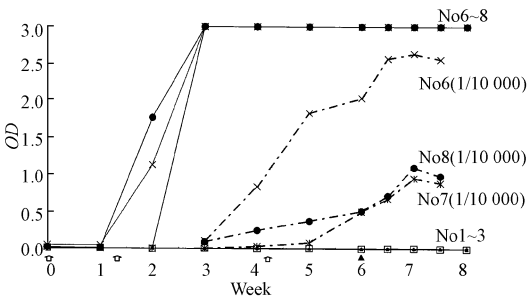


图 1 NE2 免疫猴后各周的抗 NE2-IgG 抗体 OD 值

Fig.1 The OD value of anti-NE2-IgG of monkey serial sera after immunization

↑: Vaccinated; ▲: Virus challenge; 1/10 000: Sera antibodies were detected after 1: 10 000 dilution.

◆ No 1; □ No 2; △ No 3; × No 6; \* No 7; ● No 8; ·×· No 6 (1/10 000); ·\*· No 7 (1/10 000); ·●· No 8 (1/10 000).

见 ALT 升高,说明 NE2 免疫可以较好地保护恒河猴不发病。对照组 3 只猴在第 3 周均出现抗 NE2 抗体阳转,比 Genelabs 试剂和万泰试剂阳转时间提前 4~ 7 d;疫苗组无一只出现 Genelabs 试剂和万泰试剂阳转。对照组 3 只猴均在攻毒后第 4 d 的粪便中即可检出病毒 RNA,并持续阳性至第 5 周(No3)、第 6 周(No1)和第 8 周(No2),持续排毒 1 月以上;疫苗组 1 只猴始终未检出粪便排毒(No6),另 2 只在感染后 1 周至 3 周间出现短暂排毒(No7,持续 10 d;No8,持续 6 d)。将血清 1: 10 000 稀释后检测,可见免疫组 3 只猴在病毒攻击时仍处于抗体上升阶段,在攻击后 3 d 出现抗-NE2 抗体的加速升高,但 7 d 即开始缓慢下降(图 1,虚线),可能反映了病毒攻击导致的短暂回忆反应。

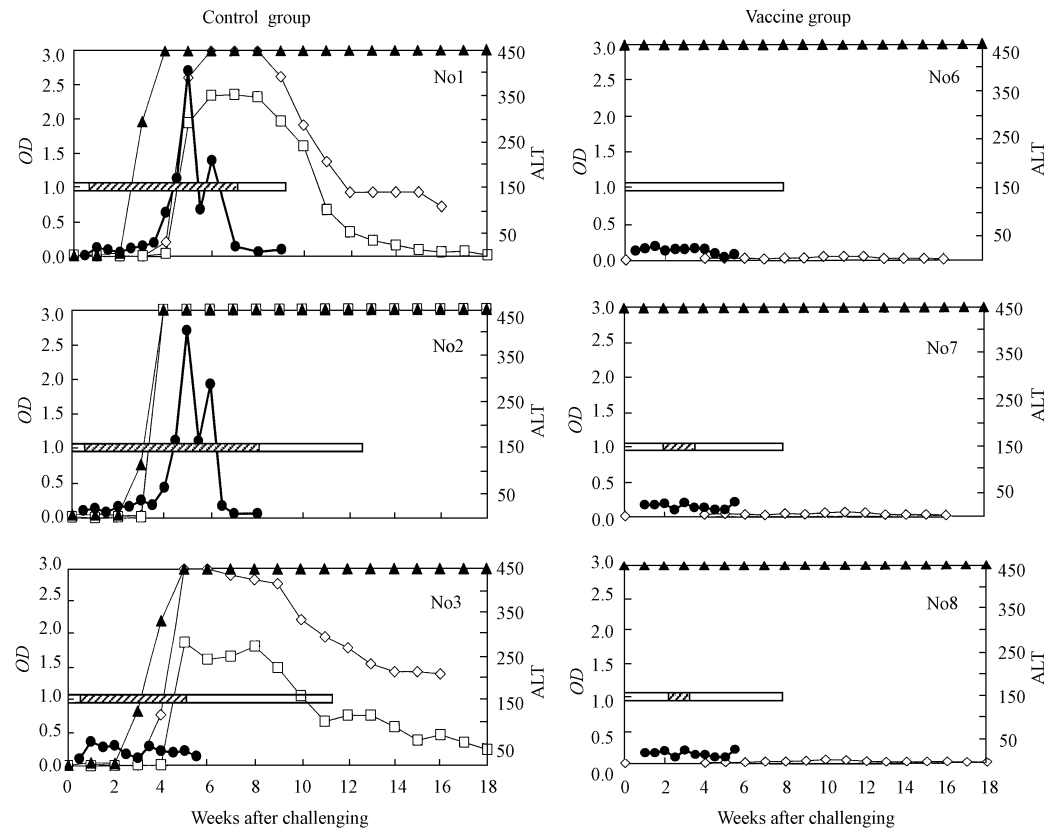


图 2 病毒攻击实验猴后的血清 ALT、抗体及粪便排毒动态

Fig. 2 Dynamics of sera ALT, antibodies and stool virus excretion after virus challenging

Left: Control group; Right: Vaccine group; X-axis: Weeks after virus challenging; left Y-axis: OD values of antibody ELISA detection; Right Y-axis: Sera ALT unit; Genelabs: Anti-HEV detected by Genelabs anti+HEV ELISA kit; YES: Anti-HEV detected by anti+HEV ELISA kit coated with antigen from YES Inc.; NE2: Anti-HEV detected by anti+HEV ELISA kit coated with NE2 as antigen; ALT: Sera ALT unit; Stool sampling time: time of stool sampled for detecting virus by RT-PCR; Virus positive sample: Stool sample positive for virus RT-PCR.

—◇— Genelabs; —□— YES; —▲— NE2; —●— ALT; —□— Stool sampling time; ▨ Virus positive sample.

2.3 免疫血清的中和保护实验

取 1 只 NE2 免疫后 35 周的猴血清(滴度 1: 20 000),与 10<sup>3</sup>PCR 滴度的 HEV 病毒混匀,

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

感染 2 只恒河猴, 从图 3 可见, 对照组 Km5 在第 6 天粪便中出现排毒, 持续排毒至第 41 天; Km6 在第 8 天开始排毒, 第 29 天排毒阴转; 而抗 NE2 血清中和组粪便中始终未检测到戊肝病毒。对照 2 只猴均在第 4 周出现抗-NE2 阳转, 血清中和组被动输入的抗体缓慢下降, 直至第 6 周 OD 值仍较高; 1 只对照猴(Km5) 在感染后第 5 周出现短暂 ALT 升高(达 200U), 同时也出现 Genelabs 抗体阳转, 而其余 3 只始终未见 ALT 异常, Genelabs 试剂也始终未测出抗体。

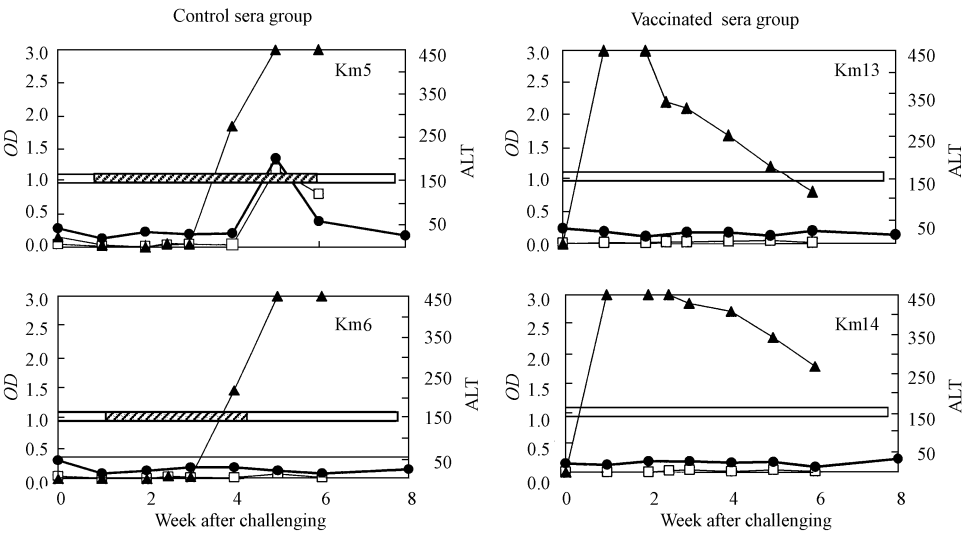


图 3 HEV 与血清中和后感染恒河猴的血清 ALT、抗体及粪便排毒动态

Fig. 3 Dynamics of sera ALT, antibodies and stool virus excretion after challenging by virus neutralized with sera Left: Control sera group; Right: Vaccinated sera group; X-axis: Weeks after virus challenging; left Y-axis: OD values of antibody ELISA detection; Right Y-axis: Sera ALT unit; Genelabs: Ant+HEV detected by Genelabs anti-HEV ELISA kit; NE2: Anti-HEV detected by ant+HEV ELISA kit coated with NE2 as antigen; ALT: Sera ALT unit; Stool sampling time: Time of stool sampled for detecting virus by RT-PCR; Virus positive sample: Stool sample positive for virus RT-PCR.

—◇— Genelabs; —▲— NE2; —●— ALT; □ Stool sampling time; ▨ Virus positive sample.

3 讨论

1993 年 Purdy 等<sup>[7]</sup> 首次报道了原核表达重组 ORF2 蛋白作为疫苗的研究结果, 他们在大肠杆菌中表达了 ORF2 的 C 端 2/3(aa225~ aa660, C2), 免疫食蟹猴后以同型及异型病毒攻击, 虽不能完全预防感染, 但可使免疫猴不发病, 显示了一定的保护作用。Robinson 等<sup>[8]</sup> 用昆虫杆状病毒表达系统表达 HEV ORF2 全长基因, 产物中可见 53kD、56kD、63kD 和 72kD 等多种大小不同的特异蛋白, 其中 56kD 蛋白( aa112~ aa607) 的 ELISA 活性最好, 用之以 0d, 28d 方案免疫恒河猴后, 以 300 000MID<sub>50</sub> 的同型病毒或 100 000MID<sub>50</sub> 异型病毒攻击, 结果从 0. 4μg/ 针组到 50μg/ 针组( 每组 4 只) 抗体滴度基本相同( 攻毒前滴度在 1: 1 000 ~ 1: 10 000) 均可保护免疫猴不发病, 但均可检出粪便排毒, 这是迄今戊肝疫苗研究中所报告的最好的保护效果<sup>[9, 10]</sup>。Zhang 等<sup>[11]</sup> 用 0. 4μg/ 针 53kD 蛋白( aa112~ aa578) 同样免疫

恒河猴, 获得了同样高滴度的抗体, 但用  $10\ 000\text{MID}_{50}$  的同型病毒攻击时, 免疫组 3 只猴均有排毒, 其中 2 只有 ALT 升高, 基本没有明显的保护性, 但粪便排毒时间和病毒滴度有较明显下降。

实验所表达出的 NE2 蛋白以  $10\mu\text{g}$ /针的剂量 0d, 10d 和 30d 免疫恒河猴, 结果 2 只免疫猴在第 2 周时抗体即已阳转, 另 1 只在 1 周后也阳转, 在第 6 周抗体滴度已达  $1:20\ 000 \sim 1:100\ 000$ , 表现出了良好的免疫原性; 此时以  $10^6$  RT-PCR 滴度的同型病毒攻击, 对照组 3 只猴呈现典型的急性戊肝表现, 先后出现粪便排毒、抗 NE2 抗体阳转、Genelabs 试剂抗体阳转、YES 试剂抗体阳转和 ALT 升高, 其中 2 只猴 ALT 高峰时超过  $400\text{U}$ ; 而疫苗组 3 只猴无一发病, 其中抗体滴度最高的 1 只(N6)始终未检出排毒, 另 2 只排毒时间也较对照明显减短, 3 只免疫猴除抗 NE2 抗体一直维持在很高水平外, 始终未出现 Genelabs 试剂和 YES 试剂抗体阳转, 表明 NE2 疫苗能对恒河猴产生良好的保护作用。本研究采用的 RT-PCR 方法与 Tsarev 等<sup>[9~11]</sup>的方法基本相同, 根据他们的估计, 该方法检测粪便病毒的检测下限相当于 100 个  $\text{MID}_{50}$ , 研究所用的病毒攻击剂量达到  $1\ 000\ 000$  RT-PCR 滴度, 虽然所采用毒株不同, 但研究所用毒株至少在 10 个 PCR 滴度剂量时仍可有效诱导恒河猴出现明显的戊肝感染(结果另文报道), 本研究的攻毒剂量至少不低于 Tsarev 等所使用的剂量, 据此推测本研究疫苗所获得的恒河猴保护性至少不低于昆虫细胞表达的 56kD 蛋白, 而本研究所达到的抗体滴度也是已有报道中最高的, 但本研究所用的佐剂是弗氏佐剂, 其辅助抗体产生的能力通常要强于临床上唯一批准使用的铝佐剂, 因此将 NE2 蛋白进一步纯化后以铝佐剂进行保护性实验将可更好地评估该蛋白作为疫苗的应用前景。

为直接验证 NE2 蛋白免疫产生的抗体的病毒中和能力, 将 NE2 免疫后 35 周的猴血清(抗体滴度  $1:20\ 000$ )与 2000 个 PCR 滴度的病毒粪悬液等体积混合后感染 2 只恒河猴, 结果抗体中和组始终未检测到粪便排毒, 也未出现 ALT 升高及 Genelabs 抗体阳转, NE2 抗体则持续下降; 对照组均持续排毒 3 周以上以及抗 NE2 抗体阳转, 其中 1 只出现 ALT 升高及 Genelabs 抗体阳转, 说明 NE2 免疫出的抗体完全中和了这一剂量的病毒的感染性, 这是迄今戊肝疫苗免疫抗体直接中和病毒的首次报道。

本研究使用三种试剂进行抗 HEV 抗体的检测。Genelabs 公司生产的抗 HEV-IgG 抗体诊断试剂是目前国际上最常用的临床诊断试剂, 使用 ORF2 C 末端的一段多肽 3-2(aa613~aa660)、ORF3 的一段多肽 4-2(aa91~aa123)和一段 ORF2 重组蛋白 SC3(aa334~aa660)作为包被抗原, 通过间接 ELISA 检测 IgG 抗体<sup>[12]</sup>; 北京万泰公司生产的抗 HEV-IgG 抗体诊断试剂使用 YES 公司提供的 HEV 抗原(主要为 ORF3 片段); 另外还用 NE2 蛋白作为抗原组装间接 ELISA 检测 IgG 抗体。从对照组猴血清抗体产生情况看, NE2 抗体的出现时间最早(在病毒攻击后 3~4 周阳转)、滴度最高、持续时间最长, Genelabs 试剂抗体检出情况与 YES 试剂类似, 但 OD 值较高。在 5 只对照猴中, 有 3 只的 Genelabs 抗体与 ALT 异常较为相关, 即在 ALT 升高前后 Genelabs 抗体阳转, 滴度迅速上升, 在 ALT 恢复正常、粪便排毒结束后抗体滴度快速下降直至完全阴转; 但另有 1 只对照猴 Genelabs 抗体在猴戊肝病程结束后仍持续存在, 1 只对照猴 Genelabs 抗体始终未阳转。这些结果表明 NE2 抗体的阳转是戊肝感染的更为灵敏的指标, 但由于其在感染恢复后仍长时间持续存在, 因此是一个较 Genelabs 试剂更好的人群感染率指标。NE2 抗体与 Genelabs 抗体的这一显著差别原

因可能在于 NE2 模拟了 HEV 衣壳表面的某些重要的构象性表位(另文发表)。其他研究人员在利用昆虫杆状病毒表达系统表达的 HEV ORF2 a. a. 112~ a. a. 607 片段形成类病毒(VLPs)或亚病毒颗粒(SLPs)中以及原核表达的 HEV ORF2 a. a. 394~ a. a. 660(ORF2. 1)同样发现存在某些与急性期和恢复期血清均有良好反应的构象性表位<sup>[13-16]</sup>, 是否这些抗原的这类恢复期构象表位以及 NE2 蛋白所模拟出的构象表位均是相同的表位目前仍无直接的证据, 制备相应的单克隆抗体对于阐明这一问题将十分有帮助。

Genelabs 公司的 IgG 试剂用于临床诊断存在相当程度的误判(漏检或假阳性)<sup>[17-20]</sup>, 本研究的数据亦体现出了这一现象。Genelabs 公司和其他一些公司虽然也有 IgM 试剂销售, 但其灵敏度和特异度均与 IgG 试剂有一定差距, 可靠的 IgM 诊断试剂的研制仍是目前急待解决的问题<sup>[21]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Zhuang H, Cao X Y, Liu C B, *et al.* Epidemiology of hepatitis E in China. *Gastroenterologia Japonica*, 1999, **36** (suppl3): 135~ 138.
- [2] Irshad M. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics. *Intervirology*, 1999, **42**: 252~ 62.
- [3] Zhang J Z, Ng M H, Xia N S, *et al.* Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. *J Med Virol*, 2001, **64**: 125~ 132.
- [4] Im S W, Zhang J Z, Zhuang H, *et al.* A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine*, 2001, **19**: 3726~ 3732.
- [5] 李少伟, 张 军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究. *生物工程学报*, 2002, **18**: 463~ 467.
- [6] 冯仁伟. 血清谷丙转氨酶测定. 见: 上海市医学化验所主编. *临床生化检验(上册)*. 上海: 上海科技出版社, 1979. 333~ 335.
- [7] Purdy M A, McCaustland K A, Krawczynski K, *et al.* Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol*, 1993, **41**: 90~ 94.
- [8] Robinson R A, Burgess W H, Emerson S U, *et al.* Structural characterization of recombinant hepatitis E virus ORF2 proteins in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression Purification*, 1998, **12**: 75~ 84.
- [9] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U, *et al.* Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, **91**: 10198 ~ 10202.
- [10] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U, *et al.* Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine*. 1997, **15**: 1834~ 1838.
- [11] Zhang M, Emerson S U, Nguyen H, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kD truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine*, 2001, **20**: 853~ 857.
- [12] 张华远. 戊型肝炎检测方法 & 疫苗研究进展. *微生物学免疫学进展*, 1998, **26**: 73~ 76.
- [13] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U, *et al.* Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J Infect Dis*, 1993, **168**: 369~ 378.
- [14] Bryan J P, Tsarev S A, Iqbal M, *et al.* Epidemic hepatitis E in Pakistan: patterns of serologic response and evidence that antibody to hepatitis E virus protects against disease. *J Infect Dis*, 1994, **170**: 517~ 521.
- [15] Anderson D A, Li F, Riddell M, *et al.* ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in *Escherichia coli*. *J Virol Methods*, 1999, **81**: 131~ 142.
- [16] McAttee C P, Zhang Y, Yarbrough P O, *et al.* Purification of a soluble hepatitis E open reading frame 2-derived protein with unique antigenic properties. *Protein Expr Purif*, 1996, **8**: 262~ 270.

- [ 17] Ghabrah T M, Tsarev S, Yarbough P O, *et al.* Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Mal Virol*, 1998, **55**: 134~ 137.
- [ 18] Goldsmith R, Yarbough P O, Reyes G R, *et al.* Enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children, *Lancet*, 1992, **339**: 328~ 331.
- [ 19] Dawson G J, Chau K H, Cabal C M, *et al.* Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Methods*, 1992, **38**: 175~ 186.
- [ 20] Khuroo M S, Kamili S, Dar M Y, *et al.* Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet*, 1993, **341**: 1355.
- [ 21] 李 奎, 庄 辉, 朱万孚, 等. 抗戊型肝炎病毒 IgG 和 IgM 抗体对诊断急性戊型肝炎的意义. 中华内科杂志 1999, **38**: 733~ 736.

## The Immuno-protect Study of a Hepatitis E Virus ORF2 Peptide Expressed in *E. coli*

Ge Shengxiang<sup>1</sup> Zhang Jun<sup>1</sup> Huang Guoyong<sup>2</sup> Pang Shuqiang<sup>1</sup> Zhou Kaijiao<sup>2</sup> Xia Ningshao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(<sup>2</sup> Guangxi anti-Epidemic & Hygiene Centre, Nanning 530021, China)

**Abstract:** A hepatitis E virus (HEV) ORF2 peptide expressed in an unfused pattern in *E. coli*, NE2, can self-assembly into homodimers and oligomers, and the immuno-reactivity of the dimers or oligomers to HEV infected serum is much stronger than monomer, which suggested that some important conformational epitopes be better exposed in dimer or oligomer form. Three Rhesus monkeys were vaccinated with three doses (10<sup>4</sup>g/dose) purified NE2 in Freud's adjuvant under a schedule of 0d, 10d, and 30d. Specific antibodies can be detected on second week, and on sixth week while virus challenge were performed with 10<sup>6</sup> PCR titer of virus positive stool suspension, the antibody titer of one monkey was 1: 100 000, the other two were both 1: 20 000. Three monkeys in control group presented typical acute hepatitis E manifestation: increased seral amino transferase (ALT), antibody conversion, and continuous virus excretion in stool. In contrast, the ALT of monkeys in vaccinated group continued to be normal, stool virus had not been detected in one monkey, and presented only a short duration in another two. One NE2-vaccinated monkey serum with antibody titer 1: 20 000 was first incubated with HEV (10<sup>3</sup> PCR titer) for neutralization, then the mixture were used to challenge two monkeys, the results showed that two monkeys in control group continued to excrete virus for more than three weeks, sera antibody conversion, and one monkey presented obvious ALT increase. Both two monkeys challenged with antibody neutralized virus had not detected virus in stool, the antibodies decreased slowly, and ALT continued to be normal. These results suggested that the prokaryotic expression recombinant protein NE2 have good immunogenicity and immunoprotectivity, and should be a good candidate for an effective hepatitis E vaccine.

**Key words:** Hepatitis E virus, Vaccine, Animal protection, Prokaryotic expression